

小菜蛾烟碱型乙酰胆碱受体 α 亚基 cDNA 的克隆、序列分析与不同发育阶段表达分析

赵宇, 杨亦桦, 武淑文, 吴益东*

(南京农业大学植物保护学院, 农业部作物病虫害监测与防控重点开放实验室, 南京 210095)

摘要: 烟碱型乙酰胆碱受体 (nAChR) 介导昆虫中枢神经系统中胆碱能突触兴奋性神经递质的快速传递, 也是新烟碱类杀虫剂和多杀菌素的作用靶标。本研究利用 RT-PCR 和 RACE 技术, 克隆了小菜蛾 *Plutella xylostella* nAChR α 亚基的一个新基因 (*Px α 8*) 的全长 cDNA (GenBank 登录号为 EU914853)。 *Px α 8* 的 cDNA 序列全长 1 744 bp, 开放阅读框为 1 602 bp, 编码 534 个氨基酸, 具有 nAChR α 亚基的典型特征, 与其他昆虫 nAChR α 8 亚基具有 77% ~ 96% 的相似性, 与果蝇 nAChR β 2 亚基具有 76% 的相似性。 *Px α 8* 的开放阅读框存在单核苷酸多态性位点, 导致多个位点氨基酸的替换。雌性 4 龄幼虫的多态性位点多于雄性 4 龄幼虫, 而且雌、雄 4 龄幼虫的多态性位点均不相同。半定量 RT-PCR 研究结果表明, *Px α 8* mRNA 在成虫期表达量高于蛹期和 4 龄幼虫期。本研究结果为进一步研究小菜蛾 nAChR 亚基的多样性和对多杀菌素的靶标抗性机制提供重要基础。

关键词: 小菜蛾; 烟碱型乙酰胆碱受体; α 亚基; cDNA 克隆; 半定量 RT-PCR

中图分类号: Q966 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2009)01-17-10

Cloning, sequence analysis and developmental expression of a cDNA encoding nicotinic acetylcholine receptor α subunit from *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae)

ZHAO Yu, YANG Yi-Hua, WU Shu-Wen, WU Yi-Dong* (College of Plant Protection, Nanjing Agricultural University, Key Laboratory of Monitoring and Management of Crop Diseases and Pest Insects, Ministry of Agriculture, Nanjing 210095, China)

Abstract: Nicotinic acetylcholine receptors (nAChR) mediate the fast action of excitatory neurotransmitter at cholinergic synapses in the central nervous system of insects and are also the target site for neonicotinoids and spinosad. By using RT-PCR and RACE technique, the full-length cDNA of a novel nAChR α subunit (*Px α 8*) was cloned from *Plutella xylostella* (GenBank accession no. EU914853). Sequence analysis showed that the full-length cDNA is 1 744 bp in length and contained an open reading frame (ORF) of 1 602 bp which encodes 534 amino acid residues. The deduced amino acid sequence of *Px α 8* shared typical features of nAChR α subunits and showed 77% – 96% amino acid similarity with insect nAChR α 8 subunit orthologues. Interestingly, it also showed 76% amino acid similarity with the nAChR β 2 subunit of *Drosophila melanogaster*. There are many single nucleotide polymorphism (SNP) sites in the ORF of *Px α 8*, some of which resulted in amino acid substitution. There are more SNPs in female 4th-instar larvae than in male 4th-instar larvae, and the SNP sites are different between the female and male 4th-instar larvae. Semi-quantitative RT-PCR analysis indicated that the mRNA expression level of *Px α 8* was higher at adult stage than at either pupal or 4th-instar larval stage. These findings provide important basis for further study on diversity of nAChR subunits and mechanism of target resistance to spinosad in *P. xylostella*.

Keywords: *Plutella xylostella*; nicotinic acetylcholine receptor; α subunit; cDNA cloning; semi-quantitative RT-PCR

基金项目: 国家“973”计划项目 (2006CB102003); 国家“863”计划项目 (2007AA10Z421); 国家自然科学基金项目 (30530530)

作者简介: 赵宇, 男, 1981 年生, 硕士研究生, 研究方向为昆虫分子毒理学, E-mail: zhaoyu418@163.com

* 通讯作者 Author for correspondence, E-mail: wyd@njau.edu.cn

收稿日期 Received: 2008-08-18; 接受日期 Accepted: 2008-11-25

烟碱型乙酰胆碱受体 (nicotinic acetylcholine receptor, nAChR) 是由 5 个亚基以不同组合形式构成的中央具离子通道的五聚体寡蛋白 (Hucho *et al.*, 1996; Karlin, 2002), 属于半胱氨酸环配体门控离子通道超家族, 这个超家族还包括脊椎动物的 γ -氨基丁酸 (γ -aminobutyric acid, GABA) 门控氯离子通道、甘氨酸受体、5-羟色胺 (5-Hydroxytryptamine, 5-HT₃) 受体以及无脊椎动物的组氨酸受体和谷氨酸门控氯离子通道 (Karlin and Akabas, 1995)。nAChR 在脊椎动物和无脊椎动物的兴奋性神经递质传导过程中起着重要的作用。在脊椎动物中, nAChR 在肌肉、中枢神经系统和周围神经系统中广泛表达 (Madden, 2002), 而在昆虫中, nAChR 主要存在于中枢神经系统中 (Millar and Denholm, 2007)。

目前, 已经从多种昆虫中克隆到 nAChR 亚基基因, 其中果蝇 *Drosophila melanogaster* 有 7 个 α 亚基 (D α 1 - D α 7) 和 3 个 β 亚基 (D β 1 - D β 3) (Sattelle *et al.*, 2005), 冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae* 有 9 个 α 亚基 Agam α 1 - Agam α 9 和 1 个 β 亚基 (Agam β 1) (Jones *et al.*, 2005), 蜜蜂 *Apis mellifera* 有 9 个 α 亚基 (Apis α 1 - Apis α 9) 和两个 β 亚基 (Apis β 1 - Apis β 2) (Jones *et al.*, 2006), 家蚕 *Bombyx mori* 有 9 个 α 亚基 (Bm α 1 - Bm α 9) 和 3 个 β 亚基 (Bm β 1 - Bm β 3) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>)。

小菜蛾 *Plutella xylostella* (L.) 属鳞翅目 (Lepidoptera) 菜蛾科 (Plutellidae), 是十字花科蔬菜的主要害虫, 同时也是抗药性发展最为严重的害虫之一 (Talekar and Shelton, 1993)。自 Ankersmit (1953) 首次报道印度尼西亚爪哇岛的小菜蛾对 DDT 产生抗性以来, 小菜蛾已对大约 50 余种杀虫剂产生了不同程度的抗药性, 几乎涉及到所有的防治用药 (Sarfranz *et al.*, 2005)。多杀菌素 (spinosad) 被广泛用于防治抗性小菜蛾, 其主要作用靶标为 nAChR。关于小菜蛾 nAChR 的研究甚少, 到目前为止, 仅克隆了 3 个 α 亚基 cDNA 片段 (未在 GenBank 上登录) (韩招久等, 2003)。因此, 进一步克隆小菜蛾的 nAChR 亚基基因, 对于研究小菜蛾对多杀菌素的靶标抗性机制具有重要意义。本文对小菜蛾 nAChR α 亚基的一个新基因 P α 8 进行了克隆和序列分析, 并对其在小菜蛾不同发育阶段的表达进行了研究。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

小菜蛾 Roth 敏感品系, 由英国洛桑实验站惠赠, 在室内不接触任何药剂情况下饲养 15 年以上。

1.2 小菜蛾烟碱型乙酰胆碱受体 α 亚基 cDNA 的克隆及序列分析

1.2.1 小菜蛾总 RNA 的提取及第一链 cDNA 的合成: 小菜蛾 4 龄幼虫、蛹及成虫总 RNA 的提取方法参照 SV Total RNA Isolation System Kit (Promega) 说明书进行, 然后以 oligo (dT)₁₈ 为锚定引物, 以总 RNA 为模板, 利用 M-MLV (Promega) 反转录酶合成第一链 cDNA。5'-和 3'-RACE-Ready cDNA 模板的合成按 BD SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit (Clontech) 说明书进行。

1.2.2 引物设计、PCR 扩增及产物的克隆与测序: 根据 GenBank 中登录的昆虫 nAChR 亚基的氨基酸序列的保守区域设计了一对简并引物: PxnAChR-F (5'-ATHTGGYTNCNGAYATHGT-3') 和 PxnAChR-R (5'-GANGTNGGNGGDATDATYTC-3')。该对引物用于扩增小菜蛾 nAChR 亚基 cDNA 片段, 预期目标片段大小 575 bp。简并引物的 PCR 反应条件为: 94℃ 预变性 3 min; 94℃ 30 s, 52℃ 1 min, 72℃ 2 min, 35 个循环; 72℃ 15 min; 4℃ 保存。

根据获得的小菜蛾 nAChR 亚基 cDNA 片段序列设计 5'-RACE 和 3'-RACE 特异性引物进行全长 cDNA 的 5' 端序列和 3' 端序列的 PCR 扩增。5' RACE 和 3' RACE 的特异性引物分别为: RACE-5'R (5'-GACTTGTTAGATGGCGGGAGGCTT-3') 和 RACE-3' F (5'-TGCTCTACAACAACCTGGGAT-3')。5'-RACE PCR 反应条件为: 94℃ 预变性 3 min; 94℃ 30 s, 58℃ 1 min, 72℃ 2 min, 35 个循环; 72℃ 15 min; 4℃ 保存。3'-RACE PCR 反应条件为: 94℃ 预变性 3 min; 94℃ 30 s, 55℃ 1 min, 72℃ 3 min, 35 个循环; 72℃ 15 min; 4℃ 保存。

利用 Wizard PCR Preps DNA 纯化试剂盒对 PCR 产物进行纯化回收。纯化产物连接到 pGEM^T easy vector (Promega) 上, 再转化到感受态大肠杆菌 DH5 α 中, 筛选阳性克隆, 由 Invitrogen 公司测序 (采用 ABI377 或 ABI3730 测序仪, 所用引物为通用测序引物 T7 和 SP6)。

1.3 系统发育树的构建

利用 ClustalX 软件将获得的小菜蛾 nAChR 亚基的氨基酸序列与 GenBank 上已登录的其他昆虫的 nAChR 亚基的氨基酸序列进行多序列比对分析, 并利用 MEGA3.0 软件中的 Neighbor-joining 法构建其系统发育树, 各分支均进行 1 000 次的重复检验。

1.4 $Px\alpha 8$ 基因在小菜蛾雌、雄 4 龄幼虫间的多态性分析

选取小菜蛾雌、雄 4 龄幼虫各 3 头, 分别进行单头总 RNA 的提取和第一链 cDNA 的合成。利用在 $Px\alpha 8$ 基因编码区两端设计的 2 对特异性巢式引物进行 PCR 扩增, 每单头测序 5 个阳性克隆, 通过序列比对分析 $Px\alpha 8$ 基因在小菜蛾雌、雄 4 龄幼虫间的单核苷酸多态性和氨基酸多态性分析。

1.5 $Px\alpha 8$ 基因在小菜蛾不同发育阶段的表达分析

采用半定量 RT-PCR 方法对 $Px\alpha 8$ 基因在小菜蛾 4 龄幼虫期、蛹期和成虫期的表达情况进行分析, 以组成型表达的延伸因子-1 α (elongation factor-1 α , EF-1 α) 为内参基因。所用 $Px\alpha 8$ 基因的引物为: SQF (5'-TGACAAAAGCGACCCCTCAAATAC-3') 和 SQR (5'-ACAGGGTTTTTCGACGCATTG-3'), 预期目标片段大小 348 bp。EF-1 α 基因的引物为: EFF (5'-GGTACAGCCTCCTGGAGAGC-3') 和 EFR (5'-GTAAGGCTGAAGGTAAATGCC-3'), 预期目标片段大小为 240 bp。

由于目的基因和内参基因引物的退火温度不同, 同时为了避免同管扩增时引物对间可能的竞争, 本实验采取了分管扩增目的基因和内参基因的方法。根据前期半定量 RT-PCR 不同反应条件的对比分析, 确定了如下的反应条件: 94℃ 预变性 3 min; 94℃ 30 s, 50℃ (对于 $Px\alpha 8$ 基因) 或 58℃ (对于 EF-1 α 基因) 1 min, 72℃ 1.5 min, 25 个循环; 72℃ 15 min; 4℃ 保存。

取 5 μ L PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳, 使用 GelDoc 凝胶成像系统 (BIO-RAD) 对电泳图片进行光密度扫描, 并用 Quantity One[®] Version 4.5 (BIO-RAD) 软件对电泳条带的积分光密度 (integral optical density, IOD) 进行定量分析。每个发育阶段进行 3 次重复, 每次重复使用 3 头试虫, 以目的基因的平均积分光密度与内参基因的平均积分光密度的比值代表目的基因的相对表达量。

2 结果与分析

2.1 小菜蛾 nAChR α 亚基 cDNA 片段的克隆

利用简并引物成功扩增出一条约 570 bp 的条带 (图 1), 与预期的 575 bp 片段大小相符, 对此条带进行纯化回收, 经克隆测序, 包括引物序列在内, 获得的 cDNA 片段总长度为 575 bp, 推导的氨基酸序列包括 191 个氨基酸残基。通过比较多个阳性克隆的测序结果, 共获得了 3 个不同的 cDNA 片段。将推导的氨基酸序列与 GenBank 中已登录的昆虫烟碱型乙酰胆碱受体基因的氨基酸序列进行 Blast 同源性分析 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), 结果表明所获得的 3 个 cDNA 片段的氨基酸序列均与其他昆虫烟碱型乙酰胆碱受体 α 亚基的氨基酸序列具有很高的相似性, 其中一个 cDNA 片段的氨基酸序列与家蚕的 $\alpha 8$ 亚基具有最高的相似性, 达到 98%; 与二化螟 *Chilo suppressalis* 的 α 亚基具有 97% 的相似性; 与猫蚤 *Ctenocephalides felis* 的 $\alpha 8$ 亚基也具有 97% 的相似性; 与冈比亚按蚊的 $\alpha 8$ 亚基具有 89% 的相似性, 因此将该 cDNA 片段序列所编码的基因命名为 $Px\alpha 8$ 。

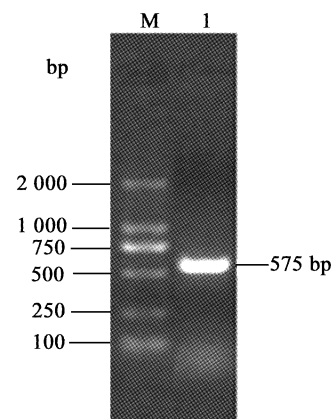


图 1 小菜蛾 nAChR 受体基因 cDNA 片段的扩增

Fig. 1 Amplification of a nAChR cDNA fragment from *Plutella xylostella*

M: DNA 分子量标准 DL2000 marker; 1: PCR 扩增产物 PCR amplification product.

2.2 小菜蛾 nAChR α 亚基 $Px\alpha 8$ 基因的全长 cDNA 序列的扩增与序列分析

根据获得的小菜蛾烟碱型乙酰胆碱受体 α 亚基 $Px\alpha 8$ 的 cDNA 片段序列分别设计用于 5'RACE 和 3'RACE 的特异性引物, 经 RACE-PCR 成功获得了 $Px\alpha 8$ 的 5'端和 3'端 cDNA 片段, 经拼接后获得

胞内环, 为 F449L, 1 个位于碳端胞外结构域, 为 F500L。

2.5 $Px\alpha 8$ 基因在小菜蛾不同发育阶段的表达分析

采用半定量 RT-PCR 的方法比较了 $Px\alpha 8$ 基因 mRNA 在小菜蛾 4 龄幼虫期、蛹期和成虫期 3 个发育阶段的表达情况。从电泳图谱(图 4)可以看出,

$Px\alpha 8$ 基因在小菜蛾 4 龄幼虫期、蛹期和成虫期均有表达, 但成虫期的表达量要显著高于 4 龄幼虫期和蛹期($P < 0.05$)。对不同发育阶段的电泳条带进行积分光密度(OD)分析, 结果进一步说明 $Px\alpha 8$ 基因在小菜蛾成虫期的表达量最高, 其次为蛹期, 4 龄幼虫期的表达量最低(图 5)。

ACGCGGGGAGTCATCTCCAGGGTGTAAAGCTGCATCTGAATTTTGTAAACATGTGCTAAAGTTTAAAAATACACATCAAA

```

1  ATGAAGTGGGAGATATTGTTTATGTGGATGGTCTTCTCCTTGGCCAGGATTTGTTTCAGGCGTAAAGCTCCTCGAAGCGAACCCGGATGTC
1  M  K  W  E  I  L  F  M  W  M  V  F  S  L  A  R  I  C  S  G  V  K  L  L  E  A  N  P  D  V
                                     Signal peptide
91  AAACGTCTATACGACGCTGCTCAGCAACTACAACCGGCTGATCCGGCCCGTGACCAACGTGAGCGACATCCTGACCGTGCGGCTCGGG
31  K  R  L  Y  D  D  L  L  S  N  Y  N  R  L  I  R  P  V  T  N  V  S  D  I  L  T  V  R  L  G
181 CTCAAGCTGTCGAGCTCATGGAGGTCAATCTCAAGAACCAGGTGATGACCACCAACCTGTGGGTGGAGCAGAAATGGTTCGACTACAAG
61  L  K  L  S  Q  L  M  E  V  N  L  K  N  Q  V  M  T  T  N  L  W  V  E  Q  K  W  F  D  Y  K
                                     Loop D
271 CTGCAGTGGAAACCCAGAGGACTACGGCGGCGTGGAGATGCTGTACGTGCCCTCCGAGCACATCTGGTTGCCCGACATCGTGCTCTACAAC
91  L  Q  W  N  P  E  D  Y  G  G  V  E  M  L  Y  V  P  S  E  H  I  W  L  P  D  I  V  L  Y  N
                                     Loop A
361 AACTGGGATGGAACTACGAGGTCAACCTCATGACAAAAGCGACCTCAAATACACAGGTGAAGTGAAGTGAAGCCTCCCGCCATCTAC
121 N  W  D  G  N  Y  E  V  T  L  M  T  K  A  T  L  K  Y  T  G  E  V  N  W  K  P  P  A  I  Y
                                     Loop E
451 AAGTCGTCATGTGAGATCAACGTGCAATACTTCCCCTTTGATGAGCAAACCTGCTTCATGAAGTTGGCTCTTGGACCTATAATGGTGCT
151 K  S  S  C  E  I  N  V  E  Y  F  P  F  D  E  Q  T  C  F  M  K  F  G  S  W  T  Y  N  G  A
                                     Cys-loop
541 CAGGTGGACCTAAACACATGGACGAGTCTCCGGTAGCAGCCTCGTGCACGTGCGCATCGACCTCAGCGAGTTCTACCTGTCGGTGGAG
181 Q  V  D  L  K  H  M  D  Q  S  S  G  S  S  L  V  H  V  G  I  D  L  S  E  F  Y  L  S  V  E
                                     Loop F
631 TGGGACATCCTGGAGGTGCCGGCCACCAGGAACGAGGAGTACTACCCGTGCTGCCCGGAGCCTTTCTCTGATATAACGTTCAAGCTGACA
211 W  D  I  L  E  V  P  A  T  R  N  E  E  Y  Y  P  C  C  P  E  F  S  D  I  T  F  K  L  T
                                     Loop C
721 ATGCGTCGAAAAACCCCTGTTCTACACTGTGAACCTCATATCCCGTGGTTCGACTCACGTTCTCTACTGTACTCGTGTCTACTTGCCC
241 M  R  R  K  T  L  F  Y  T  V  N  L  I  I  P  C  V  G  L  T  F  L  T  V  L  V  F  Y  L  P
                                     TM1
811 TCTGATTCTGGTGAAGATCTCACTCTGCATCTCGATCTGGTGTGCTCACGGTGTCTTCTCTGGGGCTGGCGGAGATCATCCGCCGG
271 S  D  S  G  E  K  I  S  L  C  I  S  I  L  V  S  L  T  V  F  F  L  G  L  A  E  I  I  P  P
                                     TM2
901 ACGTCGCTCGCCATCCCGCTGCTGGGGAAGTACCTGCTCTTACCATGATCCTGGTGTGCTGTCCGCTGTGGATGACTGTGTGCACTATT
301 T  S  L  A  I  P  L  L  G  K  Y  L  L  F  T  M  I  L  V  S  L  S  V  W  M  T  V  C  I  L
                                     TM3
991 AATGTGCATTTCAGGTCCCATCAACGCACACCATGTCCCCCTGGATGAAGAAGGTGTTTCTCCAGTGCATGCCGAAGCTGCTGATGATG
331 N  V  H  F  R  S  P  S  T  H  T  M  S  P  W  M  K  K  V  F  L  Q  C  M  P  K  L  L  M  M
1 081 AGGAGGACCAAGTACTCGCTGCCGACTATGATGATACCTTCGTGTCTAATGGGTATACCAATGAGCTGGAGATGAGCCGGGACAGTCTG
361 R  R  T  K  Y  S  L  P  D  Y  D  D  T  F  V  S  N  G  Y  T  N  E  L  E  M  S  R  D  S  L
1 171 ACGGATGCGTTCCGGAAACAGCAAGGAGGATAGCGGAGACTACCGCAAGTCTCCAGCCCCGAGGATGACATGGTGGGAGCCGGCGCGTAC
391 T  D  A  F  G  N  S  K  E  D  S  G  D  Y  R  K  S  P  A  P  E  D  D  M  V  G  A  G  A  Y
1 261 CAGCGGCCCTCGGTACGGAGTCCGAGAATGCTGCCTCGCCACCTGTGCGCCGAGGTGCGGCGCGCTGCGAGTGTGCGCTTCATC
421 Q  R  P  S  V  T  E  S  E  N  M  L  P  R  H  L  S  P  E  V  A  A  A  L  Q  S  V  R  F  I
1 351 GCTCAACATATCAAGGACGCTGACAAGGACAATGAGGTGGTGAAGACTGGAATTCATGTCGATGGTTCTGGACCGATTCTTCTCTGTG
451 A  Q  H  I  K  D  A  D  K  D  N  E  V  V  E  D  W  K  F  M  S  M  V  L  D  R  F  F  L  W
1 441 CTCTTCACTATCGCTGCTTCTGGGTACTTTTCGGCATCATATTCCAGTCACCATCACTCTACGATACCAGGGTCCAGTGGACGACGAG
481 L  F  T  I  A  C  F  V  G  T  F  G  I  I  F  Q  S  P  S  L  Y  D  T  R  V  P  V  D  Q  Q
                                     TM4
1 531 ATCTCTTCTATACCGATGCGCAAGAATAACTTCTTACCCGAAGGATATCGAGACCATTGGGATTATAAGTTAAATTTGGTTTCTATGT
511 I  S  S  I  P  M  R  K  N  N  F  F  Y  P  K  D  I  E  T  I  G  I  I  S  *
CTGTGCATACATAATAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

图 2 小菜蛾 nAChR 亚基 $Px\alpha 8$ 的核苷酸序列和推导的氨基酸序列

Fig. 2 Nucleotide and deduced amino acid sequences of the nAChR subunit $Px\alpha 8$ of *Plutella xylostella*

图中下划线分别标示了氮端信号肽序列、与配体结合相关的 6 个环状结构(Loop A - F)、1 个半胱氨酸环(Cys-loop)、4 个保守的跨膜结构域(TM1 - TM4); LoopC 中 nAChR α 亚基特有的两个相邻的半胱氨酸以 # 标示。The signal peptide sequence, six loops (Loops A - F) related to ligand binding, a cysteine loop (Cys-loop) and four transmembrane regions (TM1 - TM4) were underlined respectively. Two adjacent cysteines in LoopC specific to nAChR α subunit were indicated by “#”.

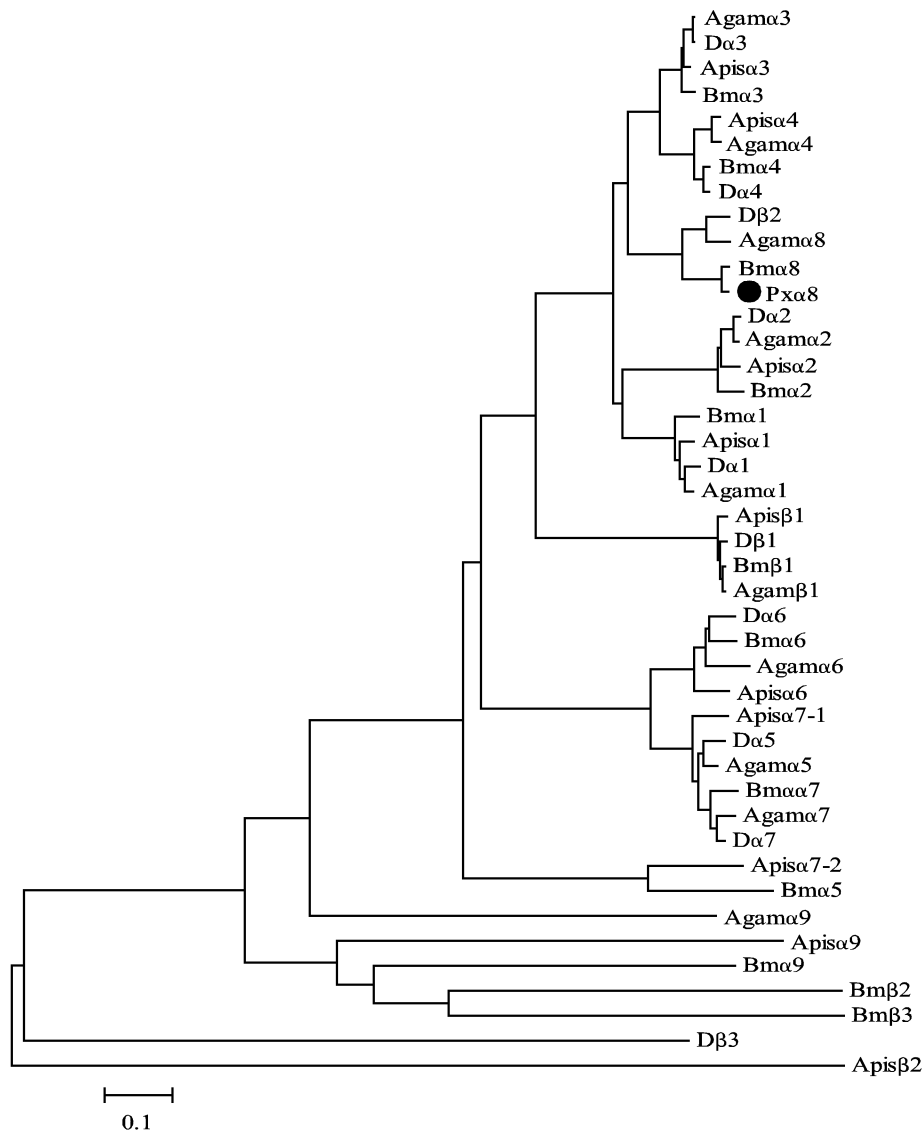


图3 昆虫烟碱型乙酰胆碱受体亚基的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree of insect nAChR subunits

冈比亚按蚊 nAChR 各亚基: Agama1, Agama2, Agama3, Agama4, Agama5, Agama6, Agama7, Agama8, Agama9, Agamβ1 (GenBank 登录号分别为 AAU12503, AAU12504, AAU12505, AAU12507, AAU12508, AAU12510, AAU12511, AAU12512, AAU12513, AAU12514); 蜜蜂 nAChR 各亚基: Apisα1, Apisα2, Apisα3, Apisα4, Apisα6, Apisα7-1, Apisα7-2, Apisα9, Apisβ1, Apisβ2 (GenBank 登录号分别为 AAY87890, AAS48080, AAY87891, AAY87893, AAY87895, AAR92109, AAS75781, AAY87896, AAY87897, AAY87898); 果蝇 nAChR 各亚基: Dα1, Dα2, Dα3, Dα4, Dα5, Dα6, Dα7, Dβ1, Dβ2, Dβ3 (GenBank 登录号分别为 CAA30172, CAA37652, CAA75689, CAB77445, AAM13390, CAD86935, CAD86936, CAA27641, CAA39211, CAC48166); 家蚕 nAChR 各亚基: Bmα1, Bmα2, Bmα3, Bmα4, Bmα5, Bmα6, Bmα7, Bmα8, Bmα9, Bmβ1, Bmβ2, Bmβ3 (GenBank 登录号分别为 ABV72683, ABV72684, ABV72685, ABV72686, ABV72687, ABL67934, ABV72688, ABV72690, ABV72691, ABV72692, ABV72693, ABV72694)。小菜蛾 nAChR 亚基: Pα8 (GenBank 登录号为 EU914853)。 *Anopheles gambiae* nAChR subunits: Agama1, Agama2, Agama3, Agama4, Agama5, Agama6, Agama7, Agama8, Agama9, Agamβ1 (GenBank accession no.: AAU12503, AAU12504, AAU12505, AAU12507, AAU12508, AAU12510, AAU12511, AAU12512, AAU12513, AAU12514); *Apis mellifera* nAChR subunits: Apisα1, Apisα2, Apisα3, Apisα4, Apisα6, Apisα7-1, Apisα7-2, Apisα9, Apisβ1, Apisβ2 (GenBank accession no.: AAY87890, AAS48080, AAY87891, AAY87893, AAY87895, AAR92109, AAS75781, AAY87896, AAY87897, AAY87898); *Drosophila melanogaster* nAChR subunits: Dα1, Dα2, Dα3, Dα4, Dα5, Dα6, Dα7, Dβ1, Dβ2, Dβ3 (GenBank accession no.: CAA30172, CAA37652, CAA75689, CAB77445, AAM13390, CAD86935, CAD86936, CAA27641, CAA39211, CAC48166); *Bombyx mori* nAChR subunits: Bmα1, Bmα2, Bmα3, Bmα4, Bmα5, Bmα6, Bmα7, Bmα8, Bmα9, Bmβ1, Bmβ2, Bmβ3 (GenBank accession no.: ABV72683, ABV72684, ABV72685, ABV72686, ABV72687, ABL67934, ABV72688, ABV72690, ABV72691, ABV72692, ABV72693, ABV72694)。 *Plutella xylostella* nAChR subunit: Pα8 (GenBank accession no. EU914853)。

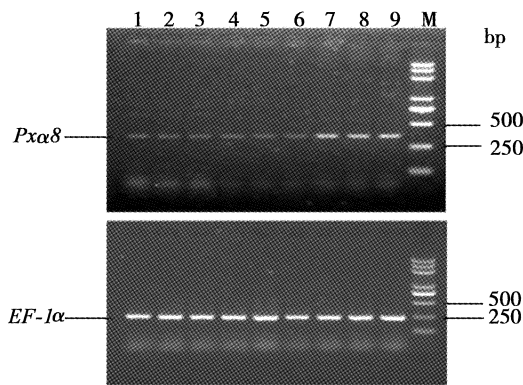


图4 小菜蛾 nAChR 亚基 $Px\alpha 8$ 基因在不同发育阶段的表达

Fig. 4 Expression profile of nAChR subunit $Px\alpha 8$ gene at different developmental stages of *Plutella xylostella*

1-3:4 龄幼虫期 4th instar larvae; 4-6:蛹期 Pupae; 7-9:成虫期 Adult; M: 2 kb 梯度 DNA 分子量标准 DL2000 marker.

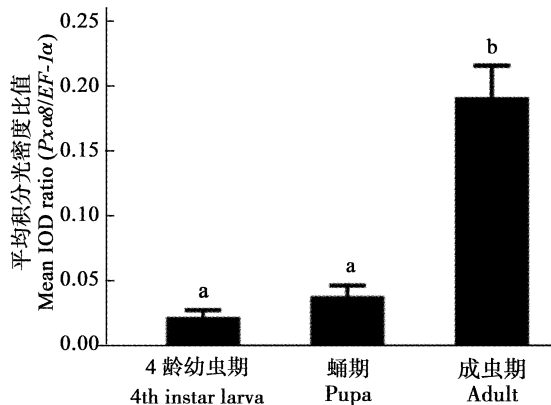


图5 小菜蛾 nAChR 亚基 $Px\alpha 8$ 基因和 $EF-1\alpha$ 基因在不同发育阶段相应电泳条带的平均积分光密度 (IOD) 比值

Fig. 5 Mean integral optical density (IOD) ratio of each band corresponds to nAChR subunit $Px\alpha 8$ gene and $EF-1\alpha$

gene at different developmental stages of *Plutella xylostella*

柱上的误差范围代表某一发育阶段 3 个重复的平均值的标准误差, 不同字母代表 Tukey 测验的显著性差异 ($P < 0.05$)。Error bars represent standard error of the means of three replicates at certain developmental stage, while different letters above the bars indicate that the means are significantly different ($P < 0.05$) in Tukey's test.

3 讨论

3.1 菜蛾 nAChR 亚基 $Px\alpha 8$ 与其他亚基的比对分析

将克隆获得的小菜蛾 nAChR 亚基 $Px\alpha 8$ 的氨基酸序列与韩招久等(2003)已发表的 3 个 nAChR 亚基基因片段 $Px\alpha 1$, $Px\alpha 2$, $Px\alpha 3$ 的氨基酸序列, 进行同源性比对分析, 发现 $Px\alpha 8$ 亚基与 $Px\alpha 2$ 亚基的相似性最高, 达 98%; 与 $Px\alpha 1$ 亚基和 $Px\alpha 3$ 亚基的相似性分别

为 72% 和 70%。由此可见, 本文克隆获得的 $Px\alpha 8$ 与 $Px\alpha 2$ 可能为编码同一亚基的不同等位基因。

3.2 烟碱型乙酰胆碱受体 (nAChR) 的亚基组成与功能

脊椎动物的大多数 nAChR 是由 α 亚基和非 α 亚基组合成的异源五聚体, 但也有由同一亚基组合成的同源五聚体 (Itier and Bertrand, 2001)。对于昆虫 nAChR 的亚基组合形式, Amar 等 (1995) 研究表明沙漠蝗 *Schistocerca gregaria* 的 nAChR 亚基 $\alpha L1$ 在异源表达系统中可以组装成同源寡聚体。Kathrin 等 (2000) 研究证明果蝇的 nAChR 亚基 $D\alpha 3$ 和 ARD 共同参与了同一 nAChR 寡聚体的形成。Huang 等 (2000) 研究发现, 在果蝇的 S2 细胞表达系统中, 桃蚜 *Myzus persicae* 的 nAChR 亚基 $Mp\beta 1$ 能够与 $Mp\alpha 1$ 和 $Mp\alpha 2$ 组装成受体, 而不能与 $Mp\alpha 3$ 和 $Mp\alpha 4$ 进行组装, 但重组受体 $Mp\beta 1/Mp\alpha 1$ 和 $Mp\beta 1/Mp\alpha 2$ 都不具有功能性。因此昆虫体内的 nAChR 的亚基组合形式还需要进一步确定。

本文克隆的小菜蛾 nAChR α 亚基 $Px\alpha 8$ 将为研究小菜蛾 nAChR 的亚基类型、亚基组合形式、药理学特征及其在小菜蛾对多杀菌素的靶标抗性机制方面的作用提供重要基础。

3.3 小菜蛾 nAChR 亚基 $Px\alpha 8$ 与其他昆虫 nAChR 亚基的同源性进化关系

同源性分析结果表明, 小菜蛾 nAChR 亚基 $Px\alpha 8$ 的氨基酸序列与家蚕的 $\alpha 8$ 亚基、冈比亚按蚊的 $\alpha 8$ 亚基、果蝇的 $\beta 2$ 亚基都具有很高的相似性。系统发育树分析结果也表明 $Px\alpha 8$ 与上述亚基具有较近的亲缘关系。有意思的是, $Px\alpha 8$ 为 α 亚基, 果蝇的 $\beta 2$ 亚基为非 α 亚基, 但两者也具有很高的相似性和较近的亲缘关系。nAChR α 亚基的氮端胞外结构域的 LoopC 中具有两个相邻的半胱氨酸, 而 β 亚基则没有 (Corringer *et al.*, 2000)。两个相邻的半胱氨酸与邻近的一个酪氨酸组成的 YxCC 基序对配基的结合具有重要作用 (Kao and Karlin, 1986; Galzi *et al.*, 1991)。

由图 6 可以看出 $Px\alpha 8$ 亚基与 $D\beta 2$ 亚基的 LoopC 结构中的氨基酸序列非常相似, 最大的区别在于 $D\beta 2$ 缺少两相邻的半胱氨酸, 冈比亚按蚊的 $\alpha 8$ 亚基 $Agam\alpha 8$ 与 $D\beta 2$ 亚基具有最高的相似性 (85%), 两者在 LoopC 中也存在相似的结构 (Jones *et al.*, 2005)。在脊椎动物中也曾报道河豚鱼 (pufferfish, *Fugu rubripes*) 的 $\beta 7$ 亚基与哺乳动物的 $\alpha 5$ 亚基具有最高的相似性 (69%) (Jones *et al.*,

2003),而哺乳动物的 $\alpha 5$ 亚基缺少 YxCC 基序中的酪氨酸(Y),与 $\beta 3$ 亚基具有最高的相似性,异源表达研究表明 $\alpha 5$ 亚基只有当与 α 亚基和 β 亚基($\alpha 3 + \beta 2$ 或者 $\alpha 3 + \beta 4$)共表达时才能形成功能性的重组 nAChR,只和 β 亚基共表达时不表现功能(Wang *et al.*, 1996),这些结果说明 $\alpha 5$ 亚基在功能上只起着类似非 α 亚基的结构性辅助作用。据此,Jones 等(2005)推测 Agam $\alpha 8$ 亚基与 D $\beta 2$ 亚基或许代表了 α 亚基与非 α 亚基间在进化上的演变。同理,小菜蛾的 Px $\alpha 8$ 亚基与 D $\beta 2$ 亚基也可能是 α 亚基与非 α 亚基间在进化上的演变,但小菜蛾的 Px $\alpha 8$ 亚基的 LoopC 中具有 YxCC 基序,对于其在配基结合中是起重要作用还是结构性辅助作用还需要进一步研究。

						*	#	#								
Pxα8	T	R	N	E	E	Y	Y	P	C	C	P	E	P	E	S	D
Agamα8	S	P	N	E	E	Y	Y	P	C	C	P	E	P	F	S	D
Dβ2	T	K	N	E	E	Y	Y	P	D	T	L	E	P	F	S	D

图 6 Px $\alpha 8$, Agam $\alpha 8$ 与 D $\beta 2$ 的 LoopC 的氨基酸序列

Fig. 6 Amino acid sequences in LoopC of

Px $\alpha 8$, Agam $\alpha 8$ and D $\beta 2$

YxCC 基序及其中的两相邻的半胱氨酸、酪氨酸分别以方框、# 和 * 标示。The YxCC motif was boxed. The two adjacent cysteines and tyrosine were indicated by “#” and “*”, respectively.

3.4 昆虫 nAChR 亚基转录水平上的调控

与脊椎动物相比,昆虫 nAChR 亚基的基因数目较少,但是转录后的修饰大大增加了昆虫 nAChR 亚基蛋白质组的多样性,其中 A-to-I mRNA 编辑是一种重要的修饰机制。A-to-I mRNA 编辑是由作用于 RNA 的腺苷脱氨基酶(ADARs)催化的对 pre-mRNA 的修饰过程,由能与 pre-mRNA 中的被编辑序列互补的被称为指导 RNA(guide RNA, gRNA)的小分子 RNA(55–70 nt)介导,使被编辑序列的腺嘌呤(A)转变为次黄嘌呤(I)(Seeburg, 2002)。翻译时,次黄嘌呤(I)被细胞机制识别为鸟嘌呤(G),所以 A-to-I mRNA 编辑的功能相当于 A 至 G 的转变。显然, A-to-I mRNA 编辑有可能导致氨基酸的替换,进而影响蛋白质组的功能。果蝇的 5 个亚基(D $\alpha 5$, D $\alpha 6$, D $\alpha 7$, D $\beta 1$, D $\beta 2$)在重要的功能区域存在 RNA 编辑,导致了氨基酸的改变(Grauso *et al.*, 2002; Hoopengardner *et al.*, 2003)。例如, D $\alpha 5$, D $\alpha 7$ 和 D $\beta 2$ 在跨膜区域 TM2-TM4 存在 RNA 编辑,导致了氨基酸的改变,这将影响离子通道的特性(Tamamizu *et al.*, 1999; Corringier *et al.*, 2000;

Guzman *et al.*, 2003)。家蝇的 $\alpha 6$ 亚基 Md $\alpha 6$ 也在多个位点发生了 RNA 编辑,并且在重要的配基结合区域导致了氨基酸的替换,这也有可能影响 Md $\alpha 6$ 亚基的功能(Gao *et al.*, 2007)。本研究发现小菜蛾 nAChR 亚基 Px $\alpha 8$ 的开放阅读框存在多个单核苷酸多态性位点,有些导致了氨基酸的替换,并且雌性 4 龄幼虫的多态性位点要多于雄性 4 龄幼虫。有些单核苷酸多态性位点是 A/G 间的转换,这些多态性位点有可能是由 RNA 编辑导致的。要弄清导致 Px $\alpha 8$ 亚基多态性的确切原因需要进一步获得其基因组序列,并且这些多态性位点对 Px $\alpha 8$ 亚基参与组成的受体功能及对雌、雄幼虫的某些特性有何种影响需要进一步深入研究。

3.5 小菜蛾 nAChR 亚基 Px $\alpha 8$ 的表达情况

本文采用半定量 RT-PCR 的方法比较了 Px $\alpha 8$ 在小菜蛾不同发育阶段的表达情况,结果表明 Px $\alpha 8$ 在成虫期表达量最高,其次是蛹期,4 龄幼虫期的表达量最低。有研究表明脊椎动物的 nAChR 亚基在不同发育阶段的表达量也存在很大差异(Gotti and Clementi, 2004)。昆虫中,果蝇的 $\alpha 6$ 亚基 D $\alpha 6$ 在胚胎期丰度最高(100%),幼虫期和成虫期都下降至 40%(Grauso *et al.*, 2002)。原位杂交实验表明蜜蜂的 Apis $\alpha 2$ 亚基在蛹期和成虫期脑中的表达情况相似,但 Apis $\alpha 7-1$ 和 Apis $\alpha 7-2$ 亚基在蛹期和成虫期脑中的表达情况都有差异,它们在蛹期的视叶(optic lobe)中没有表达,而在成虫期的视叶中有表达(Thany *et al.*, 2005)。nAChR 亚基在昆虫不同发育阶段的表达差异说明其在不同的发育阶段起着不同程度的作用。

3.6 烟碱型乙酰胆碱受体突变与昆虫抗药性

烟碱型乙酰胆碱受体是新烟碱类杀虫剂吡虫啉和多杀菌素的作用靶标,目前,已有昆虫因烟碱型乙酰胆碱受体发生突变而对吡虫啉和多杀菌素产生抗药性的报道。Liu 等(2005)研究发现褐飞虱抗吡虫啉品系 nAChR 的功能亚基 Nl $\alpha 1$ 和 Nl $\alpha 3$ 发生了 Y151S 的氨基酸突变,降低了抗性品系 nAChR 对吡虫啉的结合能力,从而使褐飞虱对吡虫啉产生了抗性。Perry 等(2008)通过 EMS 诱变并筛选得到了果蝇的 4 个抗新烟碱类杀虫剂烯啶虫胺品系,研究发现抗性品系的 nAChR 亚基 D $\alpha 1$ 和 D $\beta 2$ 发生了突变。

Perry 等(2007)研究发现果蝇的 nAChR 亚基 D $\alpha 6$ 发生功能缺失突变导致对多杀菌素具有 1 181 倍的抗性,同时预测其他昆虫中 $\alpha 6$ 亚基的突变也

可能导致对多杀菌素产生抗性。然而, Gao 等 (2007) 研究家蝇对多杀菌素的靶标抗性机制时发现 $\alpha 6$ 亚基 $Md\alpha 6$ 在敏感品系和抗性品系中没有差异, 说明 $Md\alpha 6$ 亚基在家蝇对多杀菌素的抗性中不起作用。由此可见, 不同昆虫对多杀菌素的靶标抗性机制不同。

参 考 文 献 (References)

- Amar M, Thoma P, Wonnacott S, Lunt GG, 1995. A nicotinic acetylcholine receptor subunit from insect brain forms a non-desensitising homo-oligomeric nicotinic acetylcholine receptor when expressed in *Xenopus oocytes*. *Neurosci. Lett.*, 199: 107 – 110.
- Ankersmit GW, 1953. DDT-resistance in *Plutella maculipennis* (Lep.) in Java. *Bull. Entomol. Res.*, 44: 421 – 425.
- Corringer PJ, Novere NL, Changeux JP, 2000. Nicotinic receptors at the amino acid level. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 40: 431 – 458.
- Galzi JL, Bertrand D, Devillers-Thiéry A, Revah F, Bertrand S, Changeux JP, 1991. Functional significance of aromatic amino acids from three peptide loops of the $\alpha 7$ neuronal nicotinic receptor site investigated by site-directed mutagenesis. *FEBS Lett.*, 294: 198 – 202.
- Gao JR, Deacutis JM, Scott JG, 2007. The nicotinic acetylcholine receptor subunit $Md\alpha 6$ from *Musca domestica* is diversified via post-transcriptional modification. *Insect Mol. Biol.*, 16(3): 325 – 334.
- Gotti C, Clementi F, 2004. Neuronal nicotinic receptors: From structure to pathology. *Progress in Neurobiol.*, 74: 363 – 396.
- Grauso M, Reenan RA, Culetto E, Sattelle DB, 2002. Novel putative nicotinic acetylcholine receptor subunit genes $D\alpha 5$, $D\alpha 6$ and $D\alpha 7$ in *Drosophila melanogaster* identify a new and highly conserved target of adenosine deaminase acting on RNA-mediated A-to-I pre-mRNA editing. *Genetics*, 160: 1 519 – 1 533.
- Guzman GR, Santiago J, Ricardo A, Marti-Arbona R, Rojas LV, Lasalde-Dominicci JA, 2003. Tryptophan scanning mutagenesis in the $\alpha 3$ transmembrane domain of the Torpedo californica acetylcholine receptor: Functional and structural implications. *Biochem.*, 42: 12 243 – 12 250.
- Han ZJ, Han ZJ, Li FL, Li ZY, Chen ZH, 2003. Cloning and sequence analysis of a cDNA fragment encoding α subunit of nicotinic acetylcholine receptor from *Plutella xylostella*. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 26(1): 29 – 32. [韩招久, 韩召军, 李凤良, 李忠英, 陈之浩, 2003. 小菜蛾烟碱型乙酰胆碱受体 α 亚基 cDNA 片段的克隆和序列分析. 南京农业大学学报, 26(1): 29 – 32]
- Hoopengardner B, Bhalla T, Staber C, Reenan R, 2003. Nervous system targets of RNA editing identified by comparative genomics. *Science*, 301: 832 – 836.
- Huang Y, Williamson MS, Devonshire AL, Windass JD, Lansdell SJ, Millar NS, 2000. Cloning, heterologous expression and co-assembly of *Mp $\beta 1$* , a nicotinic acetylcholine receptor subunit from the aphid *Myzus persicae*. *Neurosci. Lett.*, 284: 116 – 120.
- Hucho F, Tsetlin VI, Machold J, 1996. The emerging three-dimensional structure of a receptor-the nicotinic acetylcholine receptor. *Eur. J. Biochem.*, 239: 539 – 557.
- Itier V, Bertrand D, 2001. Neuronal nicotinic receptors: From protein structure to function. *FEBS Lett.*, 504: 118 – 125.
- Jones AK, Elgar G, Sattelle DB, 2003. The nicotinic acetylcholine receptor gene family of the pufferfish, *Fugu rubripes*. *Genomics*, 82: 441 – 451.
- Jones AK, Grauso M, Sattelle DB, 2005. The nicotinic acetylcholine receptor gene family of the malaria mosquito, *Anopheles gambiae*. *Genomics*, 85: 176 – 187.
- Jones AK, Raymond-Delpech V, Thany SH, Gauthier M, Sattelle DB, 2006. The nicotinic acetylcholine receptor gene family of the honey bee, *Apis mellifera*. *Gen. Res.*, 16: 1 422 – 1 430.
- Kao PN, Karlin A, 1986. Acetylcholine receptor binding site contains a disulfide cross-link between adjacent half-cystinyl residues. *J. Biol. Chem.*, 261: 8 085 – 8 088.
- Karlin A, 2002. Emerging structure of the nicotinic acetylcholine receptors. *Nat. Rev. Neurosci.*, 3: 102 – 114.
- Karlin A, Akabas MH, 1995. Toward a structural basis for the function of nicotinic acetylcholine receptors and their cousins. *Neuron*, 15: 1 231 – 1 244.
- Kathrin C, Regine S, Karl-Heinz S, Bert S, Eckart DG, 2000. Neuronal nicotinic acetylcholine receptors of *Drosophila melanogaster*: The α -subunit $D\alpha 3$ and the β -type subunit ARD co-assemble within the same receptor complex. *FEBS Lett.*, 482: 189 – 192.
- Liu ZW, Williamson MS, Lansdell SJ, Denholm I, Han ZJ, Millar NS, 2005. A nicotinic acetylcholine receptor mutation conferring target-site resistance to imidacloprid in *Nilaparvata lugens* (brown planthopper). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102: 8 420 – 8 425.
- Madden D, 2002. The structure and function of glutamate receptor ion channels. *Nat. Rev. Neurosci.*, 3: 91 – 100.
- Millar NS, Denholm I, 2007. Nicotinic acetylcholine receptors: Targets for commercially important insecticides. *Invert Neurosci.*, 7: 53 – 66.
- Perry T, Heckel DG, McKenzie JA, Batterham P, 2008. Mutations in *D $\alpha 1$* or *D $\beta 2$* nicotinic acetylcholine receptor subunits can confer resistance to neonicotinoids in *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 38(5): 520 – 528.
- Perry T, McKenzie JA, Batterham P, 2007. A $D\alpha 6$ knockout strain of *Drosophila melanogaster* confers a high level of resistance to spinosad. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 37: 184 – 188.
- Sarfraz M and Keddie BA, 2005. Conserving the efficacy of insecticides against *Plutella xylostella* (L.) (Lep., Plutellidae). *J. App. Entomol.*, 129(3): 149 – 157.
- Sattelle DB, Jones AK, Sattelle BM, Matsuda K, Reenan R, Biggin PC, 2005. Edit, cut and paste in the nicotinic acetylcholine receptor gene family of *Drosophila melanogaster*. *Bioessays*, 27: 366 – 376.
- Seeburg PH, 2002. A-to-I editing: New and old sites, functions and

- speculations. Neuron*, 35: 17 – 20.
- Talekar NS, Shelton AM, 1993. Biology, ecology and management of the diamondback moth. *Ann. Rev. Entomol.*, 38: 275 – 301.
- Tamamizu S, Lee YH, Hung B, McNamee MG, Lasalde-Dominicci JA, 1999. Alteration in ion channel function of mouse nicotinic acetylcholine receptor by mutations in the M4 transmembrane domain. *J. Membr. Biol.*, 170: 157 – 164.
- Thany SH, Crozatier M, Raymond-Delpech V, Gauthier M, Lenaers G, 2005. *Apis α 2*, *Apis α 7-1* and *Apis α 7-2*: Three new neuronal nicotinic acetylcholine receptor α -subunits in the honeybee brain. *Gene*, 344: 125 – 132.
- Wang F, Gerzanich V, Wells GB, Anand R, Peng X, Keyser K, Lindstrom J, 1996. Assembly of human neuronal nicotinic receptor *alpha5* subunits with *alpha3*, *beta2*, and *beta4* subunits. *J. Biol. Chem.*, 271(30): 17 656 – 17 665.

(责任编辑:邓艳)